

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-300889

(43)Date of publication of application : 05.12.1989

(51)Int.Cl.

C12N 1/20
// C12N 15/00

(21)Application number : 63-132000

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 30.05.1988

(72)Inventor : IKURA KOJI
SASAKI RYUZO
CHIBA HIDEO

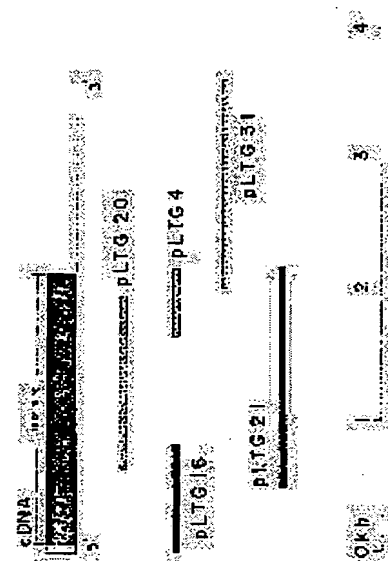
(54) TRANSFORMANT AND PRODUCTION OF MTGASE USING SAME

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A microorganism such as Escherichia coli transformed by a plasmid containing gene coding guinea pig liver transglutaminase (MTGase).

USE: For production of MTGase to modify nutrient value or physical properties by introducing various amino acids into food proteins so as to form covalent bond.

PREPARATION: For example, from clones from plural Escherichia coli containing the partially duplicate CDNA of MTGase, plasmid pLTG 16 and plasmid pLTG 21 are extracted and cut with a relevant restriction enzyme, and the resultant DNA fragments are fractionated by agarose electrophoresis followed by conjunction of the DNA fragments in the translational region coding MTGase using DNA ligase to produce a plasmid containing gene coding MTGase. Thence, this plasmid is incorporated into Escherichia coli to transform this Escherichia coli followed by culture of the resultant microorganisms, thus obtaining the objective recombinant MTGase.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

1000

[Date of extinction of right]

[illegible]

訂正有り

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-300889

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)12月5日

C 12 N 1/20
// C 12 N 15/00G-8515-4B
A-8717-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑮ 発明の名称 形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

⑯ 特 願 昭63-132000

⑰ 出 願 昭63(1988)5月30日

特許法第30条第1項適用 昭和63年4月2日 社団法人日本農芸化学会開催の「昭和63年度日本農芸化学会大会」において文書をもつて発表

⑱ 発明者 伊 倉 宏 司 京都府八幡市八幡山田26-1
 ⑱ 発明者 佐々木 隆 造 京都府京都市左京区田中東高原町14
 ⑱ 発明者 千葉 英雄 京都府宇治市広野町新成田100-131
 ⑲ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

形質転換体及びこれを用いるMTGaseの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) モルモット肝トランスグルタミナーゼ(以下MTGaseと略す)をコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物。

(2) 微生物がエシェリヒア・コリである請求項(1)記載の微生物。

(3) 請求項(1)又は(2)項記載の微生物を培地中で培養して目的とするリコンビナントMTGaseを生産させ、該リコンビナントMTGaseを培地中から採取することを特徴とするリコンビナントMTGaseの製造法。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明はMTGaseをコードする遺伝子を含有するプラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物によるリコンビナントMTGaseの製造法に関する。

る。

<従来技術>

モルモット肝トランスグルタミナーゼ(Protein-glutamine:amine γ -glutamyltransferase, EC2.3.2.13、以下TGaseと略する)はタンパク質の修飾酵素の一つであり、Ca²⁺依存性のアシル転移酵素である。基質としては、アシル供与体としてペプチド鎖中Gla残基の γ -カルボキシアミド基が、アシル受容体としてアミン化合物の第1級アミノ基やペプチド鎖中Lys残基の ϵ -アミノ基がそれぞれ反応する。

尚、反応機構は以下のとおりである。

$$\begin{array}{l}
 \text{反应规律} \\
 \begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \sum (\text{CH}_2)_x - \text{C} - \text{NH}_2 + \text{NH}_3 \xrightarrow{\text{Ca}^{++}} \sum (\text{CH}_2)_x - \text{C} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_y + \text{NH}_3 \\
 \text{Gln} \quad \text{Lys}
 \end{array} \\
 \begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \sum (\text{CH}_2)_x - \text{C} - \text{NH} - \text{R} \xrightarrow{\text{Ca}^{++}} \sum (\text{CH}_2)_x - \text{C} - \text{NH} - \text{R} + \text{NH}_3
 \end{array} \\
 \begin{array}{c}
 \text{O} \\
 \parallel \\
 \sum (\text{CH}_2)_x - \text{C} - \text{OH} \xrightarrow{\text{Ca}^{++}} \sum (\text{CH}_2)_x - \text{C} - \text{OH} + \text{H}_2\text{O}
 \end{array}
 \end{array}$$

TCase を利用すれば、蛋白質の生化学的研究、新しい酸素反応系の形成や、再利用可能な捕酵素誘導体・カゼイン複合体の形成、さらには必須アミノ酸を導入することによって食品蛋白質の栄養価を改善することができ、従って大量入手する方法の開発が望まれている。

組み込む方法は、プラスミドを適当な制限酵素で切断し、その切断部位に目的とするHICaseをコ

特開平1-300889(3)

ードする遺伝子を挿入し、接続すればよい。このようにして得られた組み換えDNAを原核生物宿主に導入し、得られた形質転換微生物の中からMTGaseを生産する株を選べば良い。本発明において、組み換えDNAが導入される微生物宿主としてはエシェリヒア・コリ、バチルス・ズブチリス等を用いることができるが、好ましくはエシェリヒア・コリを用いるのが良い。

また、本発明に用いることができるエシェリヒア・コリ用ベクターとしてはEKタイププラスミドベクター（リラックス型）、EKタイププラスミドベクター（ストリンジェント型）、 λ gt10タイプファージベクター等々の種々のベクターを用いることができる。

またプロモーターとしてはtrpプロモーター、lacプロモーターを初めとするエシェリヒア・コリ中で機能するすべてのプロモーターが利用可能である。

組み換えDNAを用いた宿主細胞の形質転換には、通常よく用いられる次の方法がある。エシェリヒ

ア・コリの如き原核生物が宿主の場合、このDNAを取り込むことの出来るコンピテント細胞は対数増殖期における細胞を回収後、良く知られているCaCl₂法によって形質転換できる。形質転換反応液中にMgCl₂又はRbClを共存させれば形質転換効率は向上する。また宿主細胞のプロトプラスト調製後形質転換させることも可能である。

形質転換された微生物を培養する培地および培養方法は通常の培地、方法でよい。すなわち培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要に応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。

炭素源としてはグルコース、シュクロース等及びこれらを含有する澱粉加水分解物、糖蜜等が用いられる。窒素源としてアンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。より好ましくはペプトン、トリプトン、肉エキス、酵母エキス等の天然素材なども使われる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ行なえば良い。

培養菌体より、リコンビナントMTGaseを採取するには、通常以下のような方法で行えば良い。

即ち、培養菌体を冷却遠心機等で集菌した後、適当なバッファーに懸濁し、超音波あるいはダイノミルなどで菌体を破碎して抽出液を得る。この菌体抽出液を硫酸沈澱分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法、抗体カラム法などを行ってリコンビナントMTGaseの精製製品が得られるわけである。

〔効果〕

本発明はモルモットの肝臓が供給源である為に①少量しかMTGaseを提供できない、②高価である、③精製操作が非常に煩雑である等の従来法の欠点を解消し得る画期的な方法である。換言すれば、本発明の方法を用いると、大量に、しかも、安く、更に、簡便にMTGaseを提供し得るのである。

このようにして得られたリコンビナントMTGaseは従来の天然型MTGaseと同様に、各種アミノ酸を食品蛋白質に共有結合的に導入することにより、栄養価や物性を改変することができる。また、本

酵素は食品以外の医薬品、化成品への応用も期待できる。

以下、本発明を実施例に従って説明する。

〔実施例1：発現プラスミドpMTG1の構築〕

本発明者等は既にMTGaseの部分重複cDNAのクローン5個を取得しており（第1図参）、またこれを基にDNA配列及びアミノ酸配列を決定している（第2図参）。

さて、まず第1図に示したプラスミドpMTG16を含有するエシェリヒア・コリMC1061（以下、E. coli MC1061とする）及びプラスミドpMTG21を含有するE. coli MC1061より以下の方法に従ってプラスミドpMTG16及びプラスミドpMTG21を抽出した。

即ち、培養液100mlを遠心分離により菌体のみ集め、50mMTriis-HCl、pH7.5の5mlに懸濁し-80℃に凍結後、融解して次にリゾチム（最終濃度、2mg/ml）を加えて0℃で10分間静置し、さらにEDTA（最終濃度0.1M）を加え、0℃で10分間静置する。その後、Triton X

(5)

4

特開平1-300889 (4)

-100 (最終濃度 0.1%) を加えて 0℃ で 60 分間静置する。ついで 30,000rpm、30 分間遠心分離し、その上清液を等量の水飽和フェノールで処理する。その水層をさらに等量のクロロホルムで処理し、その水層を抽出し、これに最終濃度 20 μg/μl となるように RNase を加え、37℃ で 60 分間インキュベートした。

その後 0.2 容の 5M NaCl と 1/3 容のポリエチレングリコールを加え、0℃ に 60 分間静置後、10,000rpm 20 分間、遠心分離により DNA 沈殿を回収する。

次にこの沈殿を 3.8 μl の水に溶解し、4 g の CsCl を加えて溶解後、10 μg/μl の EtBr の 200 μl を加えて 40,000rpm、16 時間、20℃ で超遠心分画を行う。

遠心終了後、プラスミド DNA 画分を抽出し、水飽和 n-ブタノールの 1~2 容で 4 回抽出操作を行って EtBr を除く。その後 H₂O 中で透析を行って CsCl を除去後、3M 酢酸ソーダ pH 5.6 の 1/10 容を加え、さらに 2 容の冷エタノールを加えて、

1621A を調製した。

ii) プラスミド pLTG 1621B の構築

(イ) 上記 i) で得たプラスミド pLTG 1621A を制限酵素 Sal I 及び Hind III で切断し、アガロース電気泳動分画により小さい DNA 断片 (約 1440 bp) を回収した。

(ロ) プラスミド pLTG 21 を制限酵素 Hind III 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分画により、小さい DNA 断片 (約 740 bp) を回収した。

(ハ) プラスミド pUC9 (ファルマシア社製) を制限酵素 Sal I 及び EcoRI で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きな DNA 断片を回収した。

(ニ) 上記 (イ)、(ロ)、(ハ) で得た DNA 断片を DNA リガーゼで連結させて、プラスミド pLTG 1621B を構築した。

iii) プラスミド pUTG 1 の構築

(イ) 上記 ii) で得たプラスミド pLTG 1621B を制限酵素 Nco I 及び BstE II で切断し、アガロース

-20℃ で一晩静置する。このエタノール沈殿を遠心分離で集めて 80% エタノール水溶液で洗浄後、よく乾燥し、この沈殿物を 50 μl の 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 に溶解しサンプルとした。

プラスミド pLTG 16 及び プラスミド pLTG 21 より MTCase 発現プラスミド pKTG 1 を構築した (第 3 及び 4 図)。以下に、その詳細を示した。

i) プラスミド pLTG 1621A の構築

(イ) さて、プラスミド pLTG 16 を制限酵素 Bsa I、Hind III で切断し、アガロースゲル電気泳動分画により大きい方の DNA 断片を回収した。尚第 3 図及び第 4 図において制限酵素で切断した DNA 断片の内、使用した DNA 断片は破線で示した。

(ロ) プラスミド pLTG 21 を制限酵素 Bsa I 及び Hind III で切断し、アガロースゲル電気泳動分画により、約 740 bp の DNA 断片を回収した。

(ハ) 上記 (イ) 及び (ロ) で得た DNA 断片を DNA リガーゼを用いて連結させ、プラスミド pLTG

ス電気泳動分画により約 370 bp の DNA 断片を回収した。

(ロ) 上記 ii) で得たプラスミド pLTG 1621B を制限酵素 BstE II 及び Sal I で切断し、アガロース電気泳動分画により小さい方の DNA 断片 (約 1700 bp) を回収した。

(ハ) プラスミド pUC 118N (京大、ウィルス研究先生より分譲された) を制限酵素、Nco I 及び Sal I で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きい方の DNA 断片を回収した。

(ニ) 前記 (イ)、(ロ)、(ハ) で得た DNA 断片を DNA リガーゼにより連結させてプラスミド pUTG 1 を構築した。

iv) プラスミド pKTG 1 の構築

(イ) 上記 iii) で得たプラスミド pUTG 1 を制限酵素 Nco I 及び BstE II で切断し、アガロース電気泳動分画により約 370 bp の DNA 断片を回収した。

(ロ) 上記 iii) で得たプラスミド pUTG 1 を制限酵素 BstE II 及び Pst I で切断し、アガロース電

特開平1-300889(5)

電気泳動分画により小さい方のDNA断片(約1700 bp)を回収した。

(ハ) trc プロモーター (trpプロモーター及び lac プロモーターの融合したもの) 及びアンピシリン抵抗性を有するプラスミドpKK233-2(ファルマシア社製)を制限酵素 Nco I 及び Pst I で切断し、アガロース電気泳動分画により、大きな DNA断片を回収した。

(ニ) 上記(イ)、(ロ)、(ハ)で得たDNA断片をDNA リガーゼを用いて連結させてMTGase 発現プラスミドpXTG1を構築した。

即ち、以上の操作を処することにより、2種類の重複するcDNAを有するプラスミドpLTG16及びpLTG21からMTGaseをコードする全DNA配列(開始コドンATG から終止コドンTAA まで)を含有するプラスミドpXTG1を構築したわけである。

(実施例2 大腸菌によるリコンビナントMTGaseの生産)

i) 実施例1で作成した

プラスミドpXTG1を保持するエシェリヒア・コ

リJM103株(FERM P-10008)を50 μ g/ μ lアンピシリンを含む2YT培地(1.6%バクトトリプトン、1.0%酵母エキス、1.0% NaCl、pH 6.7) 1.0 l 中で37℃、12時間培養した。

その後、誘導剤として、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG) 0.2 μ l 添加して5時間培養した。培養菌体を遠心分離により集菌し、0.15M KCl、2 mM EDTA、0.2 mM DTTを含む20 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄した後、同じ緩衝液30 μ l に懸濁した。

この集菌菌体の一部をとり、1% SDSで溶菌し、その抽出液の1部を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。コントロールとして、モルモット肝より精製したMTGase標品及びプラスミドpKK233-2で形質転換されたエシェリヒア・コリJM103株を用いた。

この電気泳動したアクリルアミドゲルをニトロセルロース膜に写しとり、抗MTGase抗体で反応させた後にパーオキシダーゼを結合した2次抗体と反応させた。このウェスタンブロッティングの結果は第5図に示した。

果は第5図に示した。

これから分るようにプラスミドpXTG1を含有するエシェリヒア・コリJM103株(FERM P-10008)は菌体内にリコンビナントMTGaseを生産していた。

ii) 上記i)により菌体内にMTGase蛋白が生産されていることを確認したので、このリコンビナントMTGaseを以下の方法で菌体より抽出した。即ち、上述の懸濁液にソニック処理(20キロサイクル、300秒)を行ない、抽出した。

この抽出液はトランスグルタミナーゼ活性を示した(第6図)。尚、コントロールとして、プラスミドpKK233-2で形質転換したエシェリヒア・コリJM103株より同様の方法で抽出した抽出液を用いた。

第6図より分るようにMTGaseはCa²⁺依存性酵素であるので、Ca²⁺が存在しないと、たとえ FERM P-10008の抽出液であってもトランスグルタミナーゼ活性は示さない。

尚、トランスグルタミナーゼ活性の測定は以下の方法で行った。

5 μ g/ μ l アセチル α_1 -カゼイン、0.13 mM (3H) ブトレシン、50 mM トリス-塩酸(pH 7.5)、5 mM CaCl₂、1.0 mM DTTおよび抽出液を含む反応液(150 μ l)を37℃でインキュベートし一定時間ごとに一定量の反応液(20 μ l)をペーパーディスク上でスポットする。未反応の(3H)ブトレシンをトリクロール酢酸で洗浄した後に、ペーパーディスク上に固着したアセチル α_1 -カゼインに取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで測定した。

(L. Loraud et al.: Anal. Biochem., 50, 623-631 (1972))に基本的にしたがっている。

(実施例3 モノクロナール抗体カラムによるリコンビナントMTGaseの精製)

実施例2 ii)で得た抽出液30 μ lを抗MTGaseモノクロナール抗体カラム(1.4 cm \times 6 cm)にアブライした。

TBS バッファー(20 mM トリス-塩酸(pH 7.5)、0.15 M KCl、0.2 mM DTT、2 mM EDTA)100 μ lで洗浄した後、溶出バッファー(20 mM NaHCO₃

(7)

6

特開平1-300889(6)

-NaOH (pH 10.4)、0.4 mM DTT、2 mM EDTA、
2 M KCl) 40 mM で目的とするリコンビナント
MTGaseを溶出した。

溶出液を20 mM のカウンターバッファー(1 M
トリス-塩酸 (pH 7.5, 0.4 mM DTT, 2 mM EDTA)
で中和した。

その後、限外濾過処理を行うことにより、精製
リコンビナントMTGaseを得た。

確認の為に SDS-PAGEを行ったところ均一なバ
ンドが得られた。この単離したリコンビナント
MTGaseのトランスグルタミナーゼ活性を測定する
と、その比活性は1690ユニット/mg $\times 10^4$ であっ
た。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、MTGase cDNA の翻訳領域及び、各遺
伝子領域を含むクローンを示す。

第2図はMTGaseのアミノ酸配列及びMTGaseをコ
ードするDNA 配列を示す。

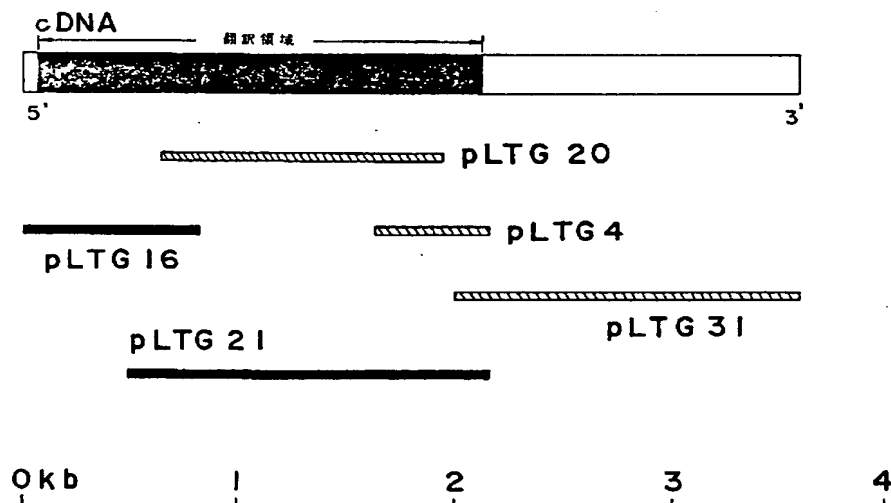
第3図はプラスミドpLTG1621Bの構築図を示す。

第4図はプラスミドpKMG1の構築図を示す。

第5図はプラスミドpKMG1により形質転換させ
たエシェリヒア・コリJM103株 (FERM P-10008)
のウェスタンブロッティングを示す。

第6図は培養した FERM P-10008 抽出液のト
ランスグルタミナーゼ活性を示す。

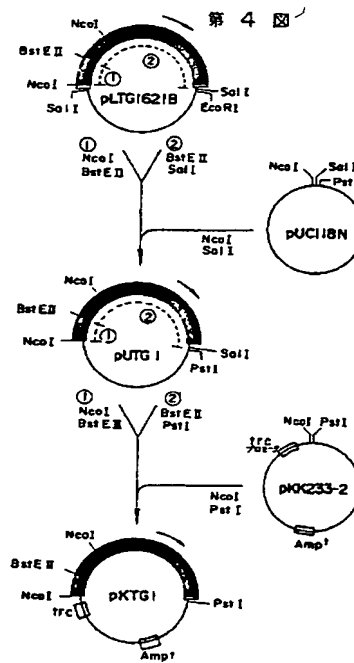
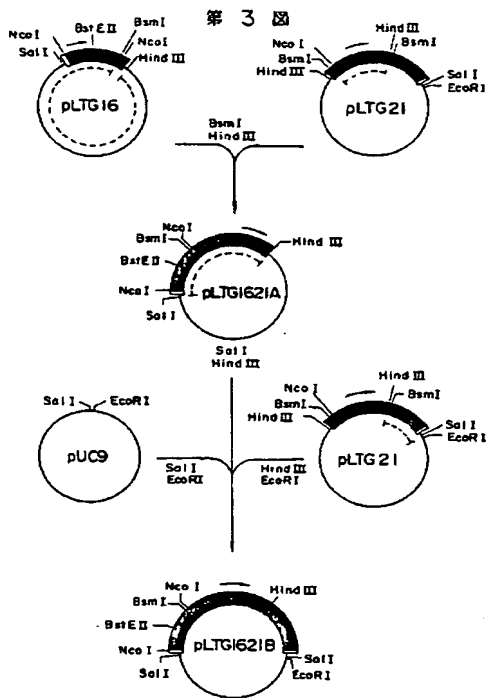
第 1 図



(9)

8

特開平1-300889 (8)



第 6 図

